



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 199 35 772.2

Anmeldetag: 26. Juli 1999

Anmelder/Inhaber: Epigenomics AG, Berlin/DE
Erstanmelder: Epigenomics GmbH, Berlin/DE

Bezeichnung: Verfahren zur relativen Quantifizierung
der Methylierung von Cytosin Basen in
amplifizierten Nukleinsäurefragmenten

IPC: C 12 Q, C 12 P

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der
ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 21. Februar 2002
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Waasmaier

**Verfahren zur relativen Quantifizierung der
Methylierung von Cytosin Basen in amplifizierten
Nukleinsäurefragmenten**

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur relativen Quantifizierung der Methylierung von Cytosin Basen in amplifizierten Nukleinsäurefragmenten.

10

5-Methylcytosin ist die häufigste kovalent modifizierte Base in der DNA eukaryotischer Zellen. Sie spielt beispielsweise eine Rolle in der Regulation der Transkription, genomischem Imprinting und in der Tumorgenese. Die Identifizierung von 5-Methylcytosin als Bestandteil genetischer Information ist daher von erheblichem Interesse.

15

5-Methylcytosin-Positionen können jedoch nicht durch Sequenzierung identifiziert werden, da 5-Methylcytosin das gleiche Basenpaarungsverhalten aufweist wie Cytosin. Darüberhinaus geht bei einer PCR-Amplifikation die epigenetische Information, welche die 5-Methylcytosine tragen, vollständig verloren.

20

Es sind mehrere Verfahren bekannt, die diese Probleme lösen. Meist wird eine chemische Reaktion oder enzymatische Behandlung der genomischen DNA durchgeführt, infolge derer sich die Cytosin von den Methylcytosin Basen unterscheiden lassen. Eine gängige Methode ist die Umsetzung von genomischer DNA mit Bisulfit, die nach alkalischer Hydrolyse in zwei Schritten zu einer Umwandlung der Cytosin Basen in Uracil führt (Shapiro, R., Cohen, B., Servis, R. Nature 227, 1047 (1970). 5-Methylcytosin bleibt unter diesen Bedingungen unverändert. Die Umwandlung von C in U führt zu einer Veränderung der Basensequenz, aus der sich durch Sequenzierung nun die ursprünglichen 5-

25

30

Methylcytosine ermitteln lassen (nur diese liefern noch eine Bande in der C-Spur).

5 Eine Übersicht über die weiteren bekannten Möglichkeiten, 5-Methylcytosine nachzuweisen, ist mitsamt der dazugehörigen Literatur dem folgenden Übersichtsartikel zu entnehmen: Rein, T., DePamphilis, M. L., Zorbas, H., Nucleic Acids Res. 26, 2255 (1998).

10 Im Stand der Technik sind verschiedene Verfahren bekannt, mit denen man Oligonukleotid-Arrays herstellen kann. Sie lassen sich grob in 3 Gruppen einteilen:

15 1) Alle Oligomere werden auf herkömmliche Weise einzeln und in relativ großer Menge in speziellen Syntheseautomaten hergestellt und danach einzeln auf den Träger aufpipettiert. Dazu verwendet man üblicherweise automatische, hochpräzise Mikropipettierroboter. Der Vorteil dieses Verfahrens ist, daß es weitgehend auf bereits optimierten Standardmethoden und -Geräten beruht. Dadurch
20 kann man qualitativ hochstehende DNA-Arrays mit mit sehr reinen Oligomeren herstellen, was einen äußerst positiven Einfluß auf die mit dem Array erzielbare Detektionsempfindlichkeit und -Zuverlässigkeit hat. Der große Nachteil des Verfahrens ist, daß es enorm aufwendig und deshalb
25 teuer ist.

30 2) Die Oligomere werden durch Pipettieren in kleinsten Mengen direkt auf dem Substrat synthetisiert. Auf jedem Rasterpunkt wird die dort vorgesehene Oligomerkette Nukleobase für Nukleobase aufgebaut. Zur Pipettierung verwendet man ähnlich wie bei Verfahren 1) einen spezialisierten Mikropipettierroboter oder z. B. eine Vorrichtung, die Kanäle zur Zuführung der einzelnen Synthesebau-

steine zu den jeweiligen Punkten des Arrays enthält (EP0915897). Das chemische Syntheseverfahren ist grundsätzlich das gleiche wie bei der herkömmlichen Oligomer-Synthese im Syntheseautomaten.

5

3) Die Oligomere werden wie bei Methode 2) direkt auf dem Substrat synthetisiert, die gezielte Anbindung der richtigen Nukleobasen an den richtigen Rasterpunkten geschieht jedoch durch eine vollkommen parallele, aus der Halbleiterfertigung stammende photolithographische Technik anstelle von sequenziellen, zielgenauen Pipettierschritten. Das Verfahren basiert darauf, daß man mit Licht einer bestimmten Wellenlänge gezielt die 5'-OH Schutzgruppen von Oligonukleotiden entfernen kann. Durch geeignete örtliche Bestrahlungsmuster kann man somit Oligonukleotid-Enden an genau jenen Rasterpunkten reaktionsfähig machen, an die man im nächsten Schritt einen neuen Nukleotidbaustein anbinden will. Bei vollständiger Benetzung der Arrayoberfläche mit einer Nukleotidbaustein-Lösung wird somit nur an den vorher belichteten Stellen eine Nukleobase angebunden, alle unbelichteten Stellen bleiben unverändert. Die örtlichen Belichtungsmuster werden erzeugt, indem man eine mikrophotographische schwarz-weiß Maske zwischen dem Substrat und der Lichtquelle positioniert, die alle Rasterstellen abdeckt, die nicht reaktionsfähig gemacht werden sollen.

10

15

20

25

Diese Methode ist wegen der hohen Parallelität in der Verarbeitung sehr schnell und effizient, zudem ist sie wegen der hohen Präzision, die mit Photolithographie erreicht werden kann, gut dazu geeignet, sehr hohe Rasterdichten zu erzielen.

30

Eine Übersicht über den Stand der Technik in der Oligomer Array Herstellung läßt sich auch einer im Januar 1999 erschienen Sonderausgabe von Nature Genetics (Nature Genetics Supplement, Volume 21, January 1999) und der dort zitierten Literatur entnehmen.

Stand der Technik, welcher sich allgemein auf die Verwendung von Oligomer Arrays und photolithographisches Maskendesign beziehen, ist z. B. US 5,837,832, US 5,856,174, WO98/27430 und US 5,856,101.

Die Amplifikation von DNA mittels PCR ist Stand der Technik.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher ein Verfahren zur relativen Quantifizierung von Cytosin-Methylierungen in genomischen DNA Proben zu schaffen, welches die Nachteile des Standes der Technik überwindet.

Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß ein Verfahren zur relativen Quantifizierung der Methylierung von Cytosin Basen in amplifizierten Nukleinsäurefragmenten zur Verfügung gestellt wird, wobei man folgende Verfahrensschritte ausführt:

a) man setzt eine genomische DNA-Probe mit einem Reagenz chemisch um, wobei 5-Methylcytosin und Cytosin unterschiedlich reagieren und diese somit nach der Reaktion ein unterschiedliches Basenpaarungsverhalten in der DNA Duplex zeigen;

b) man amplifiziert die DNA Probe, wobei man ein fluoreszenzmarkiertes dCTP-Derivat zusetzt;

c) man hybridisiert die amplifizierte DNA Probe an ein oder mehrere immobilisierte Oligomere, wobei die immobilisierten Oligomere jeweils komplementär zu mindestens einem der im Amplifikationsschritt verwendeten Primer sind; und

d) man mißt die Fluoreszenz der hybridisierten Amplifikate quantitativ.

10 Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, daß man in Schritt a) als Reagenz eine Bisulfitlösung verwendet.

Weiterhin bevorzugt ist es, daß man in Schritt b) für die Amplifikation PCR einsetzt.

15 Erfindungsgemäß besonders bevorzugt ist es, daß in Schritt b) das fluoreszenzmarkierte dCTP-Derivat Cy3-dCTP oder Cy5-dCTP ist.

20 Weiterhin ist es erfindungsgemäß besonders bevorzugt, daß man die Fluoreszenzfarbstoffe Cy3 und/oder Cy5 als Markierung verwendet.

25 Erfindungsgemäß bevorzugt ist es ferner, daß man für die Hybridisierung der Amplifikate in Schritt c) ein Array von zu den Primern aus Schritt b) komplementären Oligomeren verwendet.

30 Weiterhin bevorzugt ist es, daß man in Schritt b) die Amplifikation von mehreren DNA Abschnitten gleichzeitig durchführt.

35 Besonders bevorzugt ist es, daß man die in Schritt d) gemessenen Werte mit der Fluoreszenz anderer, analog behandelter DNA-Proben abgleicht und dadurch Information über

den relativen Methylierungsgrad unterschiedlicher Gewebe oder Zellproben erhält.

Die Erfindung beschreibt somit ein Verfahren zur relativen Quantifizierung der Cytosin Methylierung in DNA Proben. Die DNA Proben werden chemisch so behandelt, daß Cytosin und Methylcytosin unterschiedlich reagieren und nur Methylcytosin-Positionen ihr Basenpaarungsverhalten beibehalten. Nachfolgend wird die DNA amplifiziert, wobei das verwendete Cytosintriphosphat mit einer Fluoreszenzmarkierung versehen ist. Die Amplifikate werden durch Hybridisierung an ein zu mindestens einem Primer komplementäres Oligomer gebunden, und die Festphase mehrfach gewaschen. Die Fluoreszenz am Immobilisierungsort gibt nun Aufschluß über die relative Anzahl der Cytosin Methylierungen im betreffenden amplifizierten DNA Abschnitt im Vergleich zu anderen analog behandelten Proben. Besonders bevorzugt erfolgt die Hybridisierung mehrerer unterschiedlicher Amplifikate einer Probe an einen Oligomer Array, dessen Fluoreszenzmuster nunmehr Aufschluß über das Methylierungsmuster in der DNA Probe gibt. Die Muster unterschiedlicher Proben werden abgeglichen.

Die Amplifikation von DNA mittels PCR ist Stand der Technik. Besonders bevorzugt ist der erfindungsgemäße Einsatz von fluoreszenzmarkierten Nukleotiden für PCR. Damit ist es vor allem möglich, ohne eine relativ teure Fluoreszenzmarkierung der Primer zugleich mehrere Fluorophore in ein Amplifikat einzuführen. Cy5-dCTP (Cy5 ist ein kommerziell erhältlicher Fluoreszenzfarbstoff) ist von der Firma Pharmacia erhältlich.

Mit anderen Worten, die Erfindung beschreibt also ein Verfahren zur relativen Quantifizierung der Cytosin Me-

thylierung in DNA Proben. Die genomischen DNA Proben werden chemisch zunächst so behandelt, daß Cytosin und Methylcytosin unterschiedlich reagieren und nur Methylcytosin-Positionen ihr Basenpaarungsverhalten beibehalten.

5 Bevorzugt wird dabei die Behandlung mit einer Bisulfitlösung, die fast ausschließlich mit den Cytosin Nukleobasen reagiert und diese nach alkalischer Hydrolyse in Uracil überführt. 5-Methylcytosin reagiert unter den gleichen Bedingungen nicht. Die Umwandlung von C in U führt an den

10 nicht methylierten Positionen zu einer Veränderung der Basensequenz. Nachfolgend wird die DNA amplifiziert, wobei das verwendete Cytosintriphosphat mit einer Fluoreszenzmarkierung versehen ist. Bevorzugt wird hier Cy5-dCTP (Pharmacia) verwendet. Nur an den Positionen, an denen

15 keine Umwandlung von C in U stattgefunden hat, kann in der PCR ein Cy5-C und damit eine Fluoreszenzmarkierung eingebaut werden. Damit ist die Anzahl der eingebauten Cy5-dCTPs in guter Näherung proportional zum Ausmaß der Methylierung im amplifizierten DNA Abschnitt. Nun werden

20 auch in den Gegenstrang Cy5-Cs eingebaut, dort, wo sich im Bisulfit-behandelten Strang Guanin befunden hat. Dieser Einbau ist für die Fluoreszenzdetektion im Prinzip störend. Dieses Problem wird bei der vorliegenden Erfindung dadurch umgangen, daß nur relevante Einzelstränge aus der Lösung heraus an eine Festphase gebunden werden.

25 Nach einem thermischen Denaturierungsschritt werden sie durch Hybridisierung an ein zu mindestens einem Primer komplementäres und immobilisiertes Oligomer gebunden, und die Festphase anschließend mehrfach gewaschen. Die Intensität der Fluoreszenz am Immobilisierungsort gibt nun
30 Aufschluß über die relative Anzahl der Cytosin Methylierungen im betreffenden amplifizierten DNA Abschnitt im Vergleich zu anderen analog behandelten Proben. Besonders bevorzugt erfolgt die Hybridisierung mehrerer unter-

schiedlicher Amplifikate einer Probe an einen Oligomer Array, dessen Fluoreszenzmuster nunmehr Aufschluß über das Methylierungsmuster in der DNA Probe gibt. Der Oligomer Array wird bevorzugt durch das Aufbringen separat synthetisierter Oligomere auf einen Träger (Chip) oder durch photolithographische Techniken hergestellt (Stand der Technik). Das Trägermaterial ist bevorzugt durch Silanisierung derivatisiertes Glas.

- 5
- 10 Die Fluoreszenzmuster unterschiedlicher Proben werden in eine Datenbank eingegeben und abgeglichen. Besonders bevorzugt ist die Verwendung des Verfahrens für die Gewinnung von Information über den relativen Methylierungsgrad unterschiedlicher Gewebe eines Individuums und gleicher
- 15 Gewebe verschiedener Individuen.

Patentansprüche

5 1. Verfahren zur relativen Quantifizierung der Methylierung von Cytosin Basen in amplifizierten Nukleinsäurefragmenten, dadurch gekennzeichnet, daß man folgende Verfahrensschritte ausführt:

10 a) man setzt eine genomische DNA-Probe mit einem Reagenz chemisch um, wobei 5-Methylcytosin und Cytosin unterschiedlich reagieren und diese somit nach der Reaktion ein unterschiedliches Basenpaarungsverhalten in der DNA Duplex zeigen;

15 b) man amplifiziert die DNA Probe, wobei man ein fluoreszenzmarkiertes dCTP-Derivat zusetzt;

20 c) man hybridisiert die amplifizierte DNA Probe an ein oder mehrere immobilisierte Oligomere, wobei die immobilisierten Oligomere jeweils komplementär zu mindestens einem der im Amplifikationsschritt verwendeten Primer sind; und

25 d) man mißt die Fluoreszenz der hybridisierten Amplifikate quantitativ.

30 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man in Schritt a) als Reagenz eine Bisulfitlösung verwendet.

3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man in Schritt b) für die Amplifikation PCR einsetzt.

4. Verfahren einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt b) das fluoreszenzmarkierte dCTP-Derivat Cy3-dCTP oder Cy5-dCTP ist.
- 5 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man die Fluoreszenzfarbstoffe Cy3 und/oder Cy5 als Markierung verwendet.
- 10 6. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man für die Hybridisierung der Amplifikate in Schritt c) ein Array von zu den Primern aus Schritt b) komplementären Oligomeren verwendet.
- 15 7. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, daß man in Schritt b) die Amplifikation von mehreren DNA Abschnitten gleichzeitig durchführt.
- 20 8. Verfahren nach Anspruch 1, wobei man die in Schritt d) gemessenen Werte mit der Fluoreszenz anderer, analog behandelter DNA-Proben abgleicht und dadurch Information über den relativen Methylierungsgrad unterschiedlicher Gewebe oder Zellproben erhält.
- 25

Zusammenfassung

5 Beschrieben ist ein Verfahren zur relativen Quantifizierung der Methylierung von Cytosin Basen in amplifizierten Nukleinsäurefragmenten, wobei man folgende Verfahrensschritte ausführt:

10 a) man setzt eine genomische DNA-Probe mit einem Reagenz chemisch um, wobei 5-Methylcytosin und Cytosin unterschiedlich reagieren und diese somit nach der Reaktion ein unterschiedliches Basenpaarungsverhalten in der DNA Duplex zeigen;

b) man amplifiziert die DNA Probe, wobei man ein fluoreszenzmarkiertes dCTP-Derivat zusetzt;

15 c) man hybridisiert die amplifizierte DNA Probe an ein oder mehrere immobilisierte Oligomere, wobei die immobilisierten Oligomere jeweils komplementär zu mindestens einem der im Amplifikationsschritt verwendeten Primer sind; und

20 d) man mißt die Fluoreszenz der hybridisierten Amplifikate quantitativ.